



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 216 547** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) МПК⁷ **C 07 K 17/08, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68**

**RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS**

(12) SPECIFICATION TO RUSSIAN FEDERATION PATENT

(21) , (22) Application: **2002101480/04, 16.10.2001**

(24) Date of patent: **16.10.2001**

(46) Date of publication: **20.11.2003**

(56) References: **RU 2107072 C1, 20.03.1998. RU 2143004 A1, 20.12.1999. RU 2157385 A1, 10.10.2000. Vasiliskov V.A. et al. Molekulyarnaya Biologiya. 1998, No. 5, p. 923. US 5574142 A1, 12.11.1996. US5981734 A1, 20.11.1999.**

(85) Date of translation of PCT Application into national phase: **10.01.2002**

(86) PCT Application: **RU 01/00420 (16.10.2001)**

(87) PCT publication: **WO 03/03359 (24.04.2003)**

(98) Address for correspondence: **5/2, Illinka Str., 103735 Moscow, Russia, LLC "Sojuzpatent". Attn. of A.P. Agureev**

(71) Applicant: **Institut Molekulyarnoj Biologii im. V.A. Engelgardta, RAS**

(72) Inventor(s): **Mirzabekov A.D., Rubina A.Yu., Pan'kov S.V.**

(73) Patent owner: **Institut Molekulyarnoj Biologii im. V.A. Engelgardta, RAS**

**(54) METHOD FOR POLYMERIZATION IMMOBILIZATION OF BIOLOGICAL
MACROMOLECULES AND COMPOSITION FOR ITS REALIZATION**

CLAIMS

1. A composition (K) for polymerization immobilization of biological macromolecules in the formulation of a linear or three-dimensional porous polymer, including oligonucleotides, nucleic acids and proteins containing active groups in their structure, including aliphatic amino- and/or sulfhydryl groups, in polymer carriers under the condi-

tions of addition or substitution reaction in the process of polymer synthesis in photo- and chemically initiated polymerization of formulation

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f,$$

wherein

K is a composition;

A is acrylamide, methacrylamide, N-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, 2-hydroxyethylmethacrylate, or a monomer based on derivatives of acrylic, methacrylic, cinnamic, crotonic, vinylbenzoic or other unsaturated acids;

B is N,N-methylenebisacrylamide, N,N'-1,2-dihydroxyethylenebisacrylamide, polyethyleneglycol diacrylate, a mixture thereof or a symmetric or asymmetric crosslinking agent based on derivatives of acrylic, methacrylic, cinnamic, crotonic, vinylbenzoic, or other unsaturated acids;

C is a biological macromolecule comprising an oligonucleotides, a nucleic acid, a protein or another molecule bearing an active group, including an amino or sulfhydryl group;

D are components of the polymerization immobilization medium, namely, glycerin, sucrose, polyalcohols;

E are polar and non-polar solvents, such as water, N,N-dimethylformamide, dimethylsulfoxide;

F are compounds promoting photo- or chemical initiation of radical polymerization, such as ammonium persulfate, potassium persulfate, hydrogen peroxide, methylene blue, fluorescein, N,N,N',N''-tetramethylenediamine, 4-(N,N-dimethylamino)pyridine, triethylamine, acetone;

a, b, c, d, e, f are percentages (X) of each component in the composition ($X = m/v \cdot 100\%$ for solids and $X = v/v \cdot 100\%$ for liquids),

wherein the total content of monomer A and crosslinking agent B lies in the range of 3—40% ($3 \leq (a+b) \leq 40$), the monomer and crosslinking agent ratio is within 97:3—60:40 ($3 \leq [b/(a+b)] \leq 40$), the percentage of components C, D, E and F is within $0 \leq c \leq 10\%$; $0 \leq d \leq 95\%$; $0 \leq e \leq 95\%$; $0 \leq f \leq 90\%$.

2. A method of polymerization immobilization of biological molecules, including oligonucleotides, nucleic acids and proteins containing active groups in their structure, such as an amino or sulfhydryl group in the formulation of a porous polymer obtained on the basis of the composition according to claim 1 under the conditions of addition or sub-

stitution reaction in the process of polymer synthesis in photo- and chemically initiated polymerization.

3. A method of claim 2, consisting in that the polymer is obtained by polymerizing mixtures (A+B) from combinations of unsaturated compounds, such as acrylamide, methacrylamide, N-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, N,N'-(1,2-dihydroxyethylene)bisacrylamide, polyethyleneglycol diacrylate.

4. A method of claim 2, consisting in that biological macromolecules, including oligonucleotides, nucleic acids, proteins containing active groups in their structure, including amino and/or sulfhydryl groups, are reacted with fragments of the polymer carrier being formed at the moment of synthesis thereof under the conditions of addition or substitution reactions (radical, nucleophilic, electrophilic, etc.) on photo- or chemically initiated polymerization.

5. A method of claim 2, consisting in that the oligonucleotides containing active groups, including amino and/or sulfhydryl groups, aminated DNA, DNA with sulfhydryl group inserted, as well as proteins, are not subjected to modification before the immobilization process.

6. A method of claim 2, consisting in that the immobilization of proteins in the polymer carrier is performed by sulfhydryl groups.

7. A method of claim 2, consisting in that the immobilization of proteins in the polymer carrier is performed by amino groups.

8. A method of claim 2, consisting in that the immobilization of proteins in the polymer carrier is performed by third functionalities of amino acids.

9. A method of claim 2, consisting in that the immobilization of proteins in the polymer carrier is performed by the 5'-terminal of the nucleotide.

10. A method of claim 2, consisting in that the immobilization of oligonucleotides in the polymer carrier is performed by the 3'-terminal of the nucleotide.

11. A method of claim 2, consisting in that the immobilization of the formed polymer layer is covalently bonded to a support.

12. A method of claim 2, consisting in that the formed polymer layer is not bonded to the support.

13. A method of claim 2, consisting in that the polymer layer formed on the support is a three-dimensional gel.

14. A method of claim 2, consisting in that the polymer layer formed on the support is a compact continuous layer.

15. A method of claim 2, consisting in that the polymer layer formed on the support is divided by empty spaces into several cells, and each cell may contain or not contain immobilized macromolecules, and macromolecules immobilized indifferent cells may differ in their nature and properties.

16. A method of claim 15, wherein said cells form an array which is a one-dimensional or two-dimensional structure.

17. A method of claim 2, consisting in that the polymerization mixture is applied to the support with the aid of an automatic device equipped with one or more microdispensers.

18. A method of claim 17, consisting in that said microdispensers are pin-type microdispensers.

19. A method of claim 17, consisting in that said microdispensers are jet-type microdispensers.

20. A method of claim 17, consisting in that several microdispensers forming a regular structure are used.

21. A method of claim 2, consisting in that one or more supports with drops of the composition applied thereto before and during polymerization are placed in a tight container filled with one of the following gases: N₂, Ar, CO₂.

22. A method of claim 21, consisting in that the gaseous medium in the container with the supports is continuously or periodically restored.



(19) **RU** (11) **2 216 547** (13) **C2**
 (51) МПК⁷ **C 07 K 17/08, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2002101480/04, 16.10.2001
 (24) Дата начала действия патента: 16.10.2001
 (46) Дата публикации: 20.11.2003
 (56) Ссылки: RU 2107072 C1, 20.03.1998. RU 2143004 A1, 20.12.1999. RU 2157385 A1, 10.10.2000. Василисков В.А. и др. Молекулярная биология. 1998, № 5, с.923. US 5574142 A1, 12.11.1996. US 5981734 A1, 20.11.1999.
 (85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 10.01.2002
 (86) Заявка РСТ: RU 01/00420 (16.10.2001)
 (87) Публикация РСТ: WO 03/03359 (24.04.2003)
 (98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", А.П.Агурееву

(71) Заявитель:
 Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

(72) Изобретатель: Мирзабеков А.Д.,
 Рубина А.Ю., Паньков С.В.

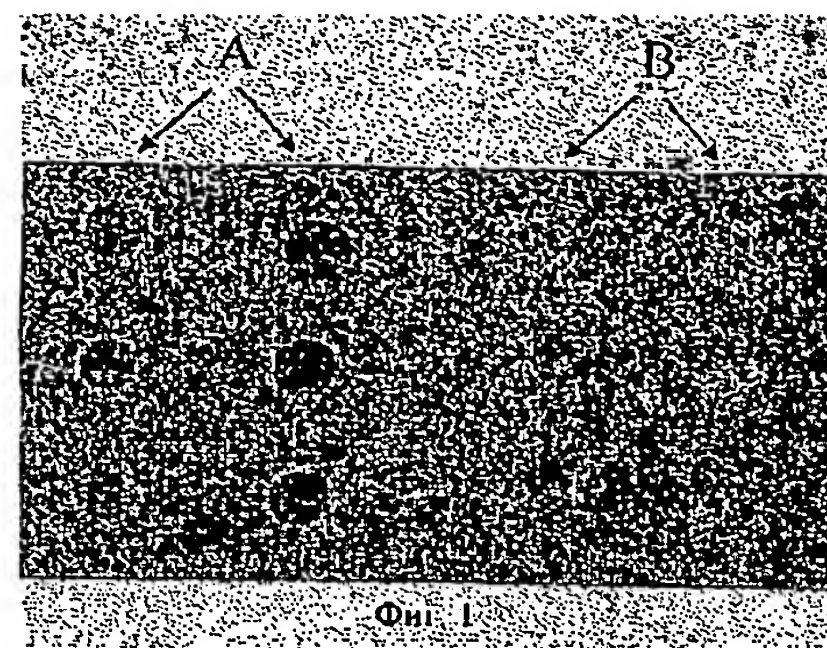
(73) Патентообладатель:
 Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

(54) СПОСОБ ПОЛИМЕРИЗАЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

(57)
 Изобретение относится к композиции состава $K=A^a+B^b+C^c+D^d+E^e+F^f$, где K - композиция; A - акриламид, метакриламид, N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат, метилметакрилат или другой мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот; B - N,N'-метилденбисакриламид, N,N'-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или другой симметричный или несимметричный сшивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот; C - олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, белок или другая молекула, несущая активную группу, в том числе amino- или сульфгидрильную группу; D - компоненты среды проведения полимеризационной иммобилизации, а именно глицерин, сахароза, полиспирты; E - вода, N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и

неполярные растворители; F - персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, перекись водорода, 4-(N, N-диметиламино)пиридин, триэтиламин, ацетон или любой инициатор для химического или фотоиницирования полимеризации; a, b, c, d, e, f - процентное содержание (X) каждого компонента в композиции ($X = m/v \cdot 100\%$ для твердых веществ или $X = v/v \cdot 100\%$ для жидких веществ), $3 < a+b < 40\%$; $0 < c < 10\%$; $0 < d < 95\%$; $0 < e < 95\%$; $0 < f < 90\%$; для полимеризационной иммобилизации различных молекул в составе линейного или трехмерного пористого полимера, в том числе олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе алифатические amino- и/или сульфгидрильные группы, в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т. д.) в процессе синтеза полимера при фото- и химическом инициировании полимеризации; способу иммобилизации молекул, в том числе

олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в составе линейного или трехмерного пористого полимера, получаемого на основе композиции (К). 2 с. и 20 з.п. ф-лы, 3 ил.



RU 2216547 C2

RU 2216547 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области молекулярной биологии и биоорганической химии и касается композиции для полимеризационной иммобилизации в полимерных носителях олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе amino- или сульфгидрильные группы, а также способа иммобилизации различных молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе amino- или сульфгидрильные группы, в составе пористого полимера, получаемого на основе предлагаемой композиции в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом иницировании полимеризации.

Предлагаемая композиция, а также способ иммобилизации молекул в полимерном носителе с использованием этих композиций могут быть использованы в различных приложениях, в том числе для изготовления микрочипов, находящих применение в молекулярной биологии при секвенировании и картировании ДНК, детектировании мутаций и целого ряда медицинских приложений.

Уровень техники

Известно, что при синтезе полимеров методом радикальной полимеризации независимо от способа ее иницирования (фото-, термическое, радиационное или химическое иницирование) используются циклические соединения или соединения, содержащие кратные связи [1]. 1. А.М. Шур, Высокомолекулярные соединения, М.: Высшая школа, 1981, с. 82-143.

Реакция протекает по радикальному цепному механизму через стадии иницирования, роста цепи и обрыва цепи. Такая природа радикальной полимеризации создает благоприятные условия для включения различных молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре amino-, сульфгидрильную или другие активные группы, в структуру полимера. Возможны по меньшей мере два пути включения:

1. Участие молекул, содержащих в своей структуре amino-, сульфгидрильную или другие активные группы, в реакции передачи цепи с образованием аминильных, тиильных или других активных радикалов. Данные радикалы способны включаться в структуру полимера как на стадии роста цепи так и на стадии обрыва цепи при межмолекулярной рекомбинации [2, 3, 4]. 2. А. Good and J.C. Thynne, J. Chem. Soc., 1967, p.684; 3. C.J. Micheida and D.H. Campbel, J.Amer.Chem. Soc., 1976, 98, p.6728; 4. C.J. Micheida and D.H. Campbel, Tetrahedron Letters, 1977, p.577.

2. Участие молекул, содержащих в своей структуре amino-, сульфгидрильную или другие активные группы, в реакции нуклеофильного присоединения с ненасыщенными соединениями [5], существующими на разных стадиях полимеризации, а именно с исходными мономерами, растущими ненасыщенными

макрорадикалами и ненасыщенными макромолекулами. 5. Общая органическая химия. Т.3, Азотсодержащие соединения./Под. ред. Н.К. Кочеткова, М.: Химия, 1982, с. 61-62.

Сущность изобретения

Сущность изобретения заключается в том, что предлагаются:

композиция для иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе amino- и/или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях (полимерах) в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом иницировании полимеризации; и

способ иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе amino- и/или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях (полимерах) в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) в момент синтеза полимера при фото- и химическом иницировании полимеризации.

Предлагаемая композиция и способ иммобилизации различных молекул в полимерном носителе с использованием этой композиции будут использоваться в различных приложениях, в том числе для изготовления микрочипов.

Для иммобилизации молекул, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе amino- или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях изобретением предлагается композиция следующего состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f$$

где K - композиция;

A - акриламид, метакриламид, N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или другой мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

B - N, N'-метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидроксиэтиленбисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или другой симметричный или несимметричный сшивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

C - олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, белок или другая молекула, несущая активную группу, в том числе amino- или сульфгидрильную группу;

D - глицерин, сахароза или полиспирты;

E - вода, N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и неполярные растворители;

F - персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N, N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, пероксид водорода, N,N-диметиламинопиридин, триэтиламин, ацетон или любой другой инициатор для химического или фотоиницирования полимеризации.

a, b, c, d, e, f - процентное содержание

(X) каждого компонента в композиции ($X = m/v \cdot 100\%$, для твердых веществ, или $X = v/v \cdot 100\%$ для жидких веществ).

$3 \leq a+b \leq 40\%$; $0 \leq c \leq 10\%$; $0 \leq d \leq 95\%$; $0 \leq e \leq 95\%$, $0 \leq f \leq 90\%$.

Наряду с полимерами иного назначения, указанную выше композицию предлагается использовать для изготовления олигонуклеотидных, белковых, ДНК(РНК) и других биологических микрочипов.

В заявляемой композиции для изготовления биологических микрочипов предлагается использовать следующие компоненты:

Мономеры, составляющие основу формируемого полимерного носителя.

В качестве мономеров, образующих линейный полимер, могут быть использованы производные акриловой, метакриловой, коричной, винилбензойной, кротоновой или других непредельных кислот, в том числе их сложные эфиры и амиды, например, акриламид, метакриламид, N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат, метилметакрилат.

В качестве сшивающих агентов для образования трехмерных гелевых структур используются соединения, содержащие в своей структуре два и более непредельных фрагмента, хотя бы один из которых активен в реакциях присоединения или замещения (радикальном, аукеофильном, электрофильном, и т.д.), например, N, N'-метиленисакриламид, N, N'-метиленисметакриламид, N, N'-1,2-дигидроксиэтиленисакриламид и т. д. или симметричные и несимметричные эфиры, амиды и смешанные производные акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот.

Общее содержание мономера, образующего линейный полимер, (А) и сшивающего агента (В) в композиции лежит в интервале 3-40% ($3 < T < 40$), а их соотношение находится в пределах 97:3-60:40% ($3 < C < 40$).

Различные сочетания и соотношения мономеров позволяют получать полимеры, с заданной величиной пор.

Олигонуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, несущие в своей структуре активные группы, в том числе amino- и сульфгидрильные группы.

Для иммобилизации олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков или других молекул в полимерном носителе в момент его синтеза при химическом и фотохимическом иницировании необходимо, чтобы иммобилизуемые молекулы содержали активные группы, способные вступать в реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) с фрагментами формируемого полимера в момент его синтеза. В частности, в качестве таких активных групп изобретением предлагаются amino- и сульфгидрильные группы.

Олигонуклеотиды, содержащие в своей структуре amino- или сульфгидрильные группы, получают в условиях стандартной фосфорамидитной химии с использованием доступных в продаже фосфордиамидитов.

Фрагменты ДНК с amino- или сульфгидрильной группой получают в условиях симметричной или ассиметричной

полимеразной цепной реакции с использованием синтетического праймера, несущего терминальную amino- или сульфгидрильную группы [6] или аминированием фрагментов ДНК по методике, приведенной в работе [7]. 6. Yasunaga, S., Kimura, A., Hamaguchi, K., Ronningen, K.S., and Sasazuki, T., Tissue Antigens, 1996, 47, 37-48; 7. Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A., Anal Biochem. 1998, 15; 259 (1), p. 34-41.

Молекулы белков, содержащие свободные amino-, сульфгидрильные и другие активные группы используют для иммобилизации в нативном виде, без дополнительных модификаций.

Содержание молекул с активными группами (С) в композициях варьируется в пределах $0 \leq c \leq 10\%$.

Среда, используемая для иммобилизации молекул с amino- и сульфгидрильными группами в полимерных носителях.

В качестве среды для полимеризационной иммобилизации молекул предлагаются вода, водные растворы поливинилового спирта, сахарозы, N,N-диметилформамида, диметилсульфоксида или других полярных водорастворимых и неполярных соединений, а также безводные диметилсульфоксид, N,N-диметилформамид и формамид и т. д. Содержание воды (Е) в композиции варьируется в пределах 0-95% (v/v), компонента (D) 0-95% (m/v; v/v).

В растворы для полимеризации могут быть добавлены различные соединения, например, глицерин, для получения композиции различной вязкости, позволяющие варьировать размер гелевых элементов микрочипа при фиксированном диаметре пина робота.

Инициаторы для химического и фотоиницирования.

Для иницирования радикальной полимеризации при синтезе полимерного носителя предлагается использовать инициаторы и промоторы полимеризации, растворимые в воде и органических средах, а именно: персульфат аммония, персульфат калия, пероксид водорода, соли двухвалентного железа, N,N,N', N'-тетраметилэтилендиамин, триэтиламин, перекись бензоила, динитрил-азобисизомасляной кислоты, N, N-диметиламинопиридин, ацетон, метиленовая синь, флуоресцеин.

Для модификации поверхности стекла с целью ковалентного связывания полимерного носителя с поверхностью предлагаются следующие реагенты:

3-(триметоксисилил)пропилметакрилат, 3-(триметоксисилил)пропилметакриламид, N-[3-(триметоксисилил)пропил]акриламид, (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан.

Такой спектр модифицирующих агентов позволяет получать надежную связь полимера со стеклом в широком диапазоне pH среды (2-12) и температуры (-10°C-100°C).

Различные сочетания компонентов композиции позволяют получать полимерные носители, пористость которых может варьироваться в широких пределах и позволяет использовать данные носители для многих приложений, в частности для изготовления биочипов.

Изобретением предлагается способ

иммобилизации молекул, в том числе олигонуклеотидов, белков и нуклеиновых кислот, содержащих в своей структуре активные группы, в составе линейного или трехмерного пористого полимера, получаемого на основе композиции состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f$$

где K - композиция;

A - акриламид, метакриламид, N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или другой мономер на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

B - N,N' - метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидроксиэтиленбисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или симметричный или несимметричный сшивающий агент на основе производных акриловой, метакриловой, коричной, кротоновой, винилбензойной или других непредельных кислот;

C - олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, белок или другая молекула, несущая активную группу, в том числе amino или сульфгидрильную группу;

D - глицерин, сахароза или полиспирты;

E - вода, N, N-диметилформамид, диметилсульфоксид и другие полярные и неполярные растворители;

F - персульфат аммония, персульфат калия, метиленовый синий, флуоресцеин, N, N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, пероксид водорода, N,N-диметиламинопиридин, триэтиламин, ацетон или любой другой инициатор для химического или фотоиницирования полимеризации.

a, b, c, d, e, f - процентное содержание (X) каждого компонента в композиции ($X = m/v \cdot 100\%$, для твердых веществ, или $X = v/v \cdot 100\%$ для жидких веществ).

$3 \leq a+b \leq 40\%$; $0 \leq c \leq 10\%$; $0 \leq d \leq 95\%$; $0 \leq e \leq 95\%$, $0 \leq f \leq 90\%$.

Предпочтительно для целей данного изобретения полимер получают полимеризацией смесей (A+B) из сочетаний акриламида, метакриламида, N-[трис(гидроксиметил)метил] акриламида, N, N'-метиленбисакриламида, N,N'-(1,2-дигидроксиэтиленбисакриламида, полиэтиленгликольдиакрилата.

Предпочтительно, когда молекулы, в том числе олигонуклеотиды, белки и нуклеиновые кислоты, содержащие в своей структуре активные группы, в том числе amino- и/или сульфгидрильные группы, реагируют с фрагментами формируемого полимерного носителя (полимера) в момент его синтеза в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т.д.) при фото- или химическом инициировании полимеризации.

Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие активные группы, в том числе amino- и/или сульфгидрильные группы, аминированная ДНК, ДНК с включенной сульфгидрильной группой, а также белки перед процессом иммобилизации не подвергаются модификации.

Далее способ характеризуется тем, что иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют либо по сульфгидрильным группам, либо по

аминогруппам, либо по третьим функциональным группам аминокислот.

Далее способ характеризуется тем, что иммобилизацию олигонуклеотидов в полимерном носителе осуществляют либо по 5'-концу олигонуклеотида, либо по 3'-концу олигонуклеотида.

Дополнительно заявленный способ характеризуется тем, что сформированный слой полимера связан с подложкой ковалентно либо ковалентно не связан с указанной подложкой.

Причем указанный сформированный на подложке слой полимера представляет собой трехмерный гель.

Далее сформированный на подложке слой полимера представляет собой сплошной непрерывный слой.

Дополнительно сформированный на подложке слой полимера разделен пустыми промежутками на несколько ячеек, причем каждая из ячеек может содержать либо не содержать иммобилизованные макромолекулы, а макромолекулы иммобилизованные в разных ячейках могут различаться по своей природе и свойствам.

Упомянутые выше ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив).

Предпочтительно осуществлять нанесение полимеризационной смеси на подложку при помощи автоматического устройства (робота), снабженного одним или несколькими микродиспенсерами, причем названные микродиспенсеры могут быть микродиспенсерами стержневого типа или бесконтактными микродиспенсерами струйного типа. Более того, в способе могут быть использованы несколько микродиспенсеров, которые образуют регулярную структуру.

Кроме того, одна или несколько подложек с нанесенными на них каплями композиции перед полимеризацией и в процессе нее размещаются в герметичном контейнере в бескислородной инертной атмосфере с контролируемой влажностью.

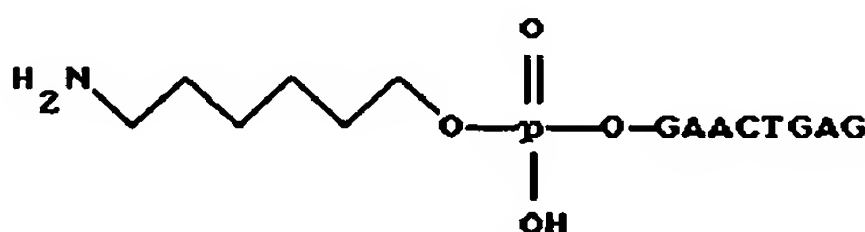
Способ предполагает, что названный контейнер заполняется одним из следующих газов: N_2 , Ar, CO_2 .

и газовая среда в контейнере с подложками непрерывно или периодически обновляется.

Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется с помощью фигур, где на

фиг. 1 представляет результаты гибридизации на биочипе олигонуклеотида, меченного флуоресцентным красителем Texas Red (5'-CTCAGTTTC-tEXrED), С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ В ГЕЛЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ. Олигонуклеотид с 5'-концевой аминогруппой



получен в стандартных условиях автоматического синтеза и иммобилизован в гелях на основе композиций 1 (A) и 2 (B). Флуоресценция после гибридизации наблюдается в ячейках биочипа, которые

соответствуют композиции 1 (А), степень иммобилизации олигонуклеотида 85%. В ячейках, соответствующих композиций 2 (В), интенсивность флуоресценции отвечает степени иммобилизации олигонуклеотида 5%. Показано влияние состава композиции на степень иммобилизации.

Композиции:

1
(метакриламид: N,N'-метиленисакриламид - Т, 5%; С, 5%);

2 (акриламид: N,N'-метиленисакриламид - Т, 5%; С, 5%).

Фиг. 2 показывает результаты гибридизации на биочипе флуоресцентно меченной пробы с иммобилизованным фрагментом ДНК.

Фрагмент ДНК, выделенный из тимуса теленка и подвергнутый процедуре аминирования, иммобилизуют в геле на основе композиции 3 (В) и гибридизуют с флуоресцентно меченным олигонуклеотидом 5'-CTCAGTTC-TexRed. В качестве контроля иммобилизуют аналогичный фрагмент ДНК, не подвергавшийся аминированию (А). Флуоресценция наблюдается в ряду В. Отсутствие флуоресценции в ряду А показывает, что иммобилизации фрагмента ДНК, не подвергавшегося аминированию, не происходит.

Фиг. 3 показывает результаты иммуноанализа на биочипе. Биочип содержит иммобилизованные в геле (на основе композиции 4) моноклональные антитела к зеленому флуоресцирующему белку (Ab-GFP), α -фетопротейну (Ab-AFP) и иммуноглобулинам G человека (Ab-HlgG), а также иммуноглобулины G человека (HlgG). Концентрация антител в геле, мкг/мл: 630 (ряд 1), 315 (ряд 2), 210 (ряд 3), 130 (ряд 4), 60 (ряд 5), 40 (ряд 6). Антитела проявляли зеленым флуоресцирующим белком (а) и антителами к HlgG, меченными флуоресцеином (б).

Далее изобретение будет пояснено с помощью примеров, иллюстрирующих предпочтительные варианты осуществления изобретения. Эти примеры не должны восприниматься, как ограничивающие объем изобретения. Специалисты в данной области смогут найти многочисленные улучшения, которые также входят в объем притязаний данного изобретения и которые отражены в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Иммобилизация олигонуклеотидов, содержащих алифатическую аминогруппу, в полимерном носителе

К раствору метакриламида (или акриламида) и N,N'-метиленисакриламида в 3М N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамине в воде (1,25 мкл, 40% (m/v), 19:1) приливают раствор олигонуклеотида в воде (2,3 мкл, С=1нмол/мкл) и глицерин (6,45 мкл). Смесь тщательно перемешивают. Раствор наносят с помощью робота "GMS 417 Arrayr" на стекло, обработанное Bind-Silane. Полученный массив капель облучают ультрафиолетом ($\lambda = 312$ нм, 30 мин, T=55°C) в среде сухого аргона, отмывают в воде (4 ч, T=60°C) и высушивают на воздухе (T=25°C) в безпылевой атмосфере. В данном примере использованы композиции состава: А - метакриламид (или акриламид) (1 и 2), В -

N,N'-метиленисакриламид, С - олигонуклеотид, D - глицерин, Е - вода, F - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, a+b=5,00%, c=0,0006%; d=65,00%; e=20,00%, f=10,00%.

5 Полученный олигонуклеотидный микрочип использовали для проведения гибридизаций, PCR и т.д.

10 На фиг.1 приведен результат гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе, полученном по вышеприведенной методике.

Пример 2. Иммобилизация аминированной ДНК в полимерном носителе

Методика аналогична приведенной в примере 1.

15 Для иммобилизации использовали ДНК из тимуса теленка, аминированную по протоколу, приведенному в работе [7]. Концентрация ДНК в полимеризационной смеси С=1мг/мл. В данном примере использована композиция 3 состава: А - метакриламид, В - N,N'-метиленисакриламид, С - ДНК, D - глицерин, Е - вода, F - N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин, a+b=5,00%, c=0,00023%; d=65,00%; e= 20,00%, f=10,00%.

25 На фиг.2 приведен результат гибридизации на ДНК-микрочипе, полученном по вышеприведенной методике.

Пример 3. Иммобилизация белка в полимерном носителе

Методика аналогична приведенной в примере 1.

30 К раствору полимеризационной смеси приливают раствор нативного белка в боратном буфере (рН 8,3). Концентрация белка в полимеризационной смеси С=630 мкг/мл. Смесь тщательно перемешивают. Раствор наносят с помощью робота "GMS 417 Arrayr" на стекло, обработанное Bind-Silane. Полученный массив капель облучают ультрафиолетом ($\lambda = 312$ нм, 40 мин, T=27°C) в среде сухого аргона. Далее белковые микрочипы отмывают в фосфатном солевом буфере (0,01 М, рН 7,0), содержащем 0,1% Tween 20, затем выдерживают 1 час в фосфатном солевом буфере (0,01 М, рН 7,0), содержащем и 1% BSA и 5% сахарозы и используют для проведения различных типов анализа.

45 В данном примере использована композиция (4) состава: А - метакриламид, В - N, N'-метиленисакриламид, С - белок, D - глицерин, Е - вода, F - N,N, N',N'-тетраметилэтилендиамин, a+b= 5,00%, c=0,0001%; d=65,00%; e=20,00%, f= 10,00%.

50 На фиг. 3 приведены результаты иммуноанализа на микрочипе.

Формула изобретения:

55 1. Композиция (К) для полимеризационной иммобилизации биологических макромолекул в составе линейного или трехмерного пористого полимера, в том числе, олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков, содержащих в своей структуре активные группы, в том числе алифатические амино- и/или сульфгидрильные группы, в полимерных носителях в условиях реакции присоединения или замещения в процессе синтеза полимера при фото- и химическом иницировании полимеризации состава

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e + F^f,$$

где К - композиция;

А - акриламид, метакриламид,

N-[трис(гидроксиметил)метил]-акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат или другой мономер на основе производных непредельных кислот, таких, как акриловая, метакриловая, коричная, кротоновая, винилбензойная;

В - симметричный или несимметричный сшивающий агент на основе производных непредельных кислот, таких, как акриловая, метакриловая, коричная, кротоновая, винилбензойная в том числе N, N'-метиленисакриламид, N, N'-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь;

С - биологическая макромолекула, представляющая собой олигонуклеотид, нуклеиновую кислоту, белок или другая молекула, несущая активную группу, в том числе, amino- или сульфгидрильную группу;

Д - компоненты среды проведения полимеризационной иммобилизации, а именно глицерин, сахароза, полиспирты;

Е - полярные и неполярные растворители такие, как вода, N, N-диметилформамид, диметилсульфоксид;

Ф - соединения, способствующие фото- или химическому инициированию радикальной полимеризации, такие, как персульфат аммония, персульфат калия, пероксид водорода, метиленовый синий, флуоресцеин, N, N, N', N''-тетраметилэтилендиамин, 4-(N, N-диметиламино)пиридин, триэтиламин, ацетон;

a, b, c, d, e, f - процентное содержание (X) каждого компонента в композиции ($X = m/v \cdot 100\%$ для твердых веществ и $X = v/v \cdot 100\%$ для жидких веществ),

в которой общее содержание мономера А и сшивающего агента В лежит в интервале 3-40% ($3 \leq (a+b) \leq 40$), соотношение мономера и сшивающего агента находится в пределах 97:3-60: 40 ($3 \leq [b/(a+b)] \leq 40$), процентное содержание компонентов С, D, Е и F находится в пределах $0 \leq c \leq 10\%$; $0 \leq d \leq 95\%$; $0 \leq e \leq 95\%$; $0 \leq f \leq 90$.

2. Способ полимеризационной иммобилизации биологических молекул, в том числе олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков, содержащих в своей структуре активные группы, такие, как amino- или сульфгидрильную группу, в составе пористого полимера, получаемого на основе композиции по п. 1, в условиях реакции присоединения или замещения в момент синтеза полимера при фото- или химическом инициировании полимеризации.

3. Способ по п. 2, заключающийся в том, что полимер получают путем полимеризации смесей (А+В) из сочетаний непредельных соединений таких, как акриламид, метакриламид, N-[трис(гидроксиметил)метил] акриламид, N, N'-метиленисакриламид, N, N'-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат.

4. Способ по п. 2, заключающийся в том, что биологические макромолекулы в том числе олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, белки, содержащие в своей структуре активные группы, в том числе amino- и/или сульфгидрильные группы, реагируют с фрагментами формируемого полимерного носителя (полимера) в момент

его синтеза в условиях реакции присоединения или замещения (радикального, нуклеофильного, электрофильного и т. д.) при фото- или химическом инициировании полимеризации.

5. Способ по п. 2, заключающийся в том, что олигонуклеотиды, содержащие активные группы, в том числе amino- и/или сульфгидрильные группы, аминированная ДНК, ДНК с включенной сульфгидрильной группой, а также белки перед процессом иммобилизации не подвергаются модификации.

6. Способ по п. 2, заключающийся в том, что иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют по сульфгидрильным группам.

7. Способ по п. 2, заключающийся в том, что иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют по аминогруппам.

8. Способ по п. 2, заключающийся в том, что иммобилизацию белков в полимерном носителе осуществляют по третьим функциональным группам аминокислот.

9. Способ по п. 2, заключающийся в том, что иммобилизацию олионуклеотидов в полимерном носителе осуществляют по 5'-концу олигонуклеотида.

10. Способ по п. 2, заключающийся в том, что иммобилизацию олигонуклеотидов в полимерном носителе осуществляют по 3'-концу олигонуклеотида.

11. Способ по п. 2, заключающийся в том, что сформированный слой полимера ковалентно связан с подложкой.

12. Способ по п. 2, заключающийся в том, что сформированный слой полимера ковалентно не связан с подложкой.

13. Способ по п. 2, заключающийся в том, что сформированный на подложке слой полимера представляет собой трехмерный гель.

14. Способ по п. 2, заключающийся в том, что сформированный на подложке слой полимера представляет собой сплошной непрерывный слой.

15. Способ по п. 2, где сформированный на подложке слой полимера разделен пустыми промежутками на несколько ячеек, причем каждая из ячеек может содержать либо не содержать иммобилизованные макромолекулы, а макромолекулы иммобилизованные в разных ячейках, могут различаться по своей природе и свойствам.

16. Способ по п. 15, где указанные ячейки образуют массив, представляющий собой одномерную или двумерную структуру.

17. Способ по п. 2, заключающийся в том, что полимеризационную смесь на подложку наносят с помощью автоматического устройства, снабженного одним или несколькими микродиспенсерами.

18. Способ по п. 17, заключающийся в том, что указанные микродиспенсеры являются микродиспенсерами стержневого типа.

19. Способ по п. 17, заключающийся в том, что указанные микродиспенсеры являются микродиспенсерами струйного типа.

20. Способ по п. 17, заключающийся в том, что используют несколько микродиспенсеров, образующих регулярную структуру.

21. Способ по п. 2, заключающийся в том, что одну или несколько подложек с нанесенными на них каплями композиции перед полимеризацией и в процессе ее

размещают в герметичном контейнере, который заполняют одним из следующих газов: N₂, Ar, CO₂.

22. Способ по п. 21, заключающийся тем, что газовую среду в контейнере с подложками непрерывно или периодически обновляют.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-10-

RU 2216547 C2

RU 2216547 C2